

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

200101 B

(51) Int. Cl.⁵

A 61 K 37/02

(22) Bejelentés napja: 1986.12.16. (21) 5225/86

(30) Bejelentés elsőbbsége:
(811,081) 1985.12 17. US

(40) Közzététel napja: 1987.09.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.04.30.

(72) Feltalálók:

BENNETT William Franklin, San Francisco,
BUILDER Stuart Elliot, Belmont,
GATLIN Larry Alan, Concord,
Kalifornia, (US)

(73) Szabadalmaz:

Genentech, INC.
South San Francisco,
Kalifornia, (US)

(54) ELJÁRÁS HUMÁN SZÖVET PLAZMINOGÉN AKTIVÁTORT TARTALMAZÓ STABILIZÁLT GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

Eljárás új, hatóanyagként humán szövet plazminogén aktivátort tartalmazó stabilizált, folyékony gyógyszerkészítmény vagy abból készült szilárd liofilizátum előállítására, amelynek során 0,1 - 50 mg/ml humán szövet plazminogén aktivátort vizes oldatban 0,02-1 mól/liter argininium-iont szolgáltató vegyületet tartalmazó, 4 és 9 közötti pH-értéket biztosító, gyógyászati szempontból elfogadható pufferrel és kívánt esetben 0,0005-1 tömeg/tf.% gyógyászati szempontból elfogadható, nem-ionos felületaktív szerrel és/vagy egy- vagy többféle gyógyászati szempontból elfogadható hígítószerrel elegyítenek, úgy választva meg az említett anyagokat és az esetleges adalékokat, hogy a készítmény klorid-ion tartalma 0,3 mól/liter alatt legyen, és kívánt esetben az elegyet liofilizálják.

HU 200101 B

A leírás terjedelme: 9 oldal, 3 rajz, 3 ábra

A találmány tárgya eljárás olyan új gyógyszerkészítmények előállítására, amelyek a humán szövet plazminogén aktivátor (t-PA) proteint tartalmazzák. Közelebbről, a találmány tárgya eljárás a t-PA komponens szempontjából javított stabilitású és oldhatósági tulajdonságú gyógyszerkészítmények előállítására, amelyek könnyű liofilizálást, és ezen keresztül olyan stabil, liofilizált formák előállítását teszik lehetővé, amelyek hatékonyan használhatók humán terápiás célokra.

A humán hullák érrendszeréből extrahált vaszkuláris plazminogén aktivátor instabilitását Aoki [J. Biol. Chem. (Tokió), 75, 731 (1974)] írta le. Aoki azt találta, hogy az aktivátort csak nagy nátrium-klorid koncentrációk, közelebbről, körülbelül 0,5 mólnál nagyobb nátrium-klorid koncentrációk stabilizálták.

Binder és munkatársai [J. Biol. Chem. 254, 1998 (1979)] leírták, hogy egy többlépéses tisztítási eljárás során magas só- és arginin-tartalmú pufferek alkalmazása alapvető az emberi hullák perfuzátjaiból származó vaszkuláris plazminogén aktivátor aktivitásának fenntartásához. A tisztítási lépéseket 0,3 - 1,0 mól nátrium-klorid és 0,1 mól arginin jelenlétében hajtották végre.

Radcliff és munkatársai [Arch. of Biochem. and Biophys. 189, 185 (1978)] a plazminogén aktivátor humán plazmából történő elkülönítését írták le lizin-Sepharose-on végzett kromatografálással. Egy kísérletben a stabilizált plazmából nyert nyers plazminogén aktivátort lizin-Sepharose-zal eluálták, 0 - 0,5 mól, 0,6 mólos nátrium-kloridban jelenlévő arginin gradienst alkalmazva.

Természetes szövet forrásból származó humán szövet plazminogén aktivátort ismeretnek Collen és munkatársai az 1981. december 16-án nyilvánosságra hozott, 1980. június 11-i elsőbbséget igénylő 041766. számú európai szabadalmi bejelentésben. A szerzők olyan tisztítási rendszert alkalmaztak, amely a szövet plazminogén aktivátort viszonylag nagy tisztaságban bocsátja rendelkezésre. Collen és munkatársai tanulmányozták tisztított szövet plazminogén aktivátor készítményeik stabilitását is, mind folyékony, mind liofilizált állapotban, és azt találták, hogy a liofilizált formák reprodukálhatóan labilisak voltak, még akkor is, ha 0,3 mól nátrium-kloridot tartalmazó oldatokból kerültek előállításra.

Annak érdekében, hogy a szövet plazminogén aktivátorhoz hasonló anyagokat az egészségügyi dolgozók illetve a betegek rendelkezésére lehessen bocsátani, ezeket gyógyszerkészítmények formájában kell kiszerezni. Az ilyen készítményeknek alkalmas ideig stabilnak kell lenniük, alkalmasnak kell lenniük humán alkalmazásra, és könnyen előállíthatóknak kell lenniük. Ilyen készítmény lehetne például egy parenterális adagolásra alkalmas oldat. Bár sok esetben az

oldatos gyógyszerkészítményeket folyadék formában, közvetlen adagolásra alkalmas módon szerelik ki, előállíthatók fagyasztott vagy liofilizált formában is. Az előbbi esetben a készítményt használat előtt fel kell olvasztani. Az utóbbi megoldást gyakran azzal a céllal használják, hogy a készítmény hatóanyagának stabilitását változó tárolási körülmények között javítsák, miután szakember számára ismeretes, hogy a liofilizált készítmények általában stabilabbak, mint folyékony megfelelőik. Az ilyen liofilizált készítményeket alkalmazás előtt alkalmas, gyógyászatilag elfogadható hígítóanyag(ok), például injekciók

esetében steril víz vagy steril fiziológiás sóoldat hozzáadásával vissza lehet alakítani eredeti formájukba.

A találmány stabil humán szövet plazminogén aktivátor készítmények, különösen liofilizált formában stabil készítmények előállítására vonatkozik.

Találmányunk azon a felismerésen alapul, hogy az arginin (argininium ionként történő) bevitele a szövet plazminogén aktivátor (t-PA) egy gyógyászatilag elfogadható készítményébe szignifikánsan növeli a t-PA stabilitását és oldhatóságát, és - alkalmas ellenionokkal társítva - stabil, liofilizált kiszerezési formák előállítását teszi lehetővé.

Általában a készítmények más komponenseket is tartalmazhatnak előnyösen olyan mennyiségben, amely nem akadályozza stabil, liofilizált formák előállításának, és olyan mennyiségben, amely alkalmas hatásos, biztonságos gyógyszerkészítmények előállítására.

A találmány szerinti készítményekben a pH körülbelül 4 és 9 között kell, hogy legyen, előnyösen azonban - miután a készítményeket gyógyászati alkalmazásra szánjuk - a fiziológiás tartományban van, tehát közel semleges. Ebben a pH tartományban az arginin elsődlegesen +1 töltésű protonált kation formájában van jelen, amely „argininium ion”-nak nevezhető. Az „arginin” kifejezést az „argininium ion” kifejezéssel azonos értelemben használjuk, mert a rendszer pH-jának következtében az „argininium ion” ekvivalens megjelölés.

Az elektromos semlegesség megtartása érdekében az argininium iont ekvivalens mennyiségű, ellentétes töltésű (azaz negatív) ionnal kell semlegesíteni. Az ilyen ionokat „ellenionok”-nak nevezzük. Az argininium ion, más kationos specíesek és ezek különböző ellenionjai kombinációját „argininium iont tartalmazó puffer rendszer”-ként jelöljük. Ellenionként olyan gyógyászatilag elfogadható ionok alkalmazhatók, amelyek a készítmény euteptikus és összeesési (collapse) hőmérsékletét úgy tudják beállítani, hogy a készítmény különösen alkalmassá váljon liofilizálásra. Ilyen ellenionok például az acetát, foszfát, citrát, szukcinát, szulfát, tartarát, maleát, karbonát ionok, és ezek funkcionális

megfelelő. A nem megfelelő ellenionok közül példaképpen a klorid iont említjük meg.

Mint már említettük, a feltalálók azt találták, hogy az arginin (argininium ionként történő) beépítése t-PA-t tartalmazó gyógyszerkészítményekbe jelentősen növeli a t-PA oldhatóságát és stabilitását ezekben a készítményekben. Az arginin-koncentrációk körülbelül 0,02 mól és 1 mól, előnyösen körülbelül 0,05 - 1,0 mól, még előnyösebben körülbelül 0,1 mól és 0,5 mól között változnak az adagolásra használt oldatban és/vagy a liofilizált vagy liofilizálás előtti oldatokban.

Ezen felül a javított készítmények adott esetben tartalmazhatnak még egy vagy több nem-ionos detergenst, így polysorbate 20-t vagy polysorbate 80-at vagy hasonlókat, körülbelül 0,001 - 1 % mennyiségben, a t-PA stabilitásának további javítása érdekében. Ezenkívül egyéb, gyógyszerátalag elfogadható, szakember számára jól ismert vivőanyagok is részei lehetnek a készítményeknek. Ezek közé tartozhatnak például különböző töltőanyagok, további pufferek, kelatáló szerek, anti-oxidánsok, tartósítószer, társoldószer és hasonló, amelyek közül példaképpen a következőket említjük: mannitol, trometamin sók (.Tris puffer'), dinátrium-edetát, zselatin, humán szérum albumin vagy más polipeptid, különböző oligopeptid, így glicil-glicin.

A találmány szerinti t-PA készítményekben meglepő módon nincs szükség nagy koncentrációjára, azaz 0,3 mól vagy e feletti nátrium-klorid alkalmazására. Sőt, a klorid ion nagy koncentrációban való jelenléte hátrányosan befolyásolja a javított készítmények liofilizálhatóságát. Bár bizonyos mennyiségű klorid ion jelenléte megengedhető, előnyben részesítjük a kis, azaz körülbelül 0,3 mólnál kisebb és előnyösen a normál fiziológiai szintet, azaz körülbelül 0,12 mólt meg nem haladó nátrium-klorid koncentrációkat. Legelőnyösebben a találmány szerinti készítmények egyáltalán nem tartalmaznak klorid iont.

A t-PA „gyógyászati hatásos mennyisége” kifejezést olyan mennyiség jelölésére alkalmazzuk, amely különböző adagolási tartományokban gyógyhatást eredményez. A készítmények ennek megfelelően körülbelül legalább 0,1 mg/ml-től egészen körülbelül 50 mg/ml t-PA-t tartalmazó formákban kerülhetnek kiszerezésre. Az előnyös t-PA koncentráció körülbelül 0,4 mg/ml és 5 mg/ml között van. Ha a készítményeket például miokardiális infarktuszban szenvedő humán pácienseknek kívánjuk adagolni, ezek körülbelül 0,4 mg/ml és 3 mg/ml közötti t-PA mennyiséget tartalmazhatnak, az ilyen kezelések esetében jelenleg alkalmazott dózis értékének megfelelően.

A találmány szerinti készítmények kiterjednek a liofilizált formákra. A készítmények előállítása a komponensekből általánosan ismert gyógyszerkészítmény előállítási eljárás-

sokkal, önmagukban ismert módon történik. Hasonlóképpen, standard liofilizálási eljárásokat és az irodalomból jól ismert liofilizáló berendezéseket alkalmazunk. A találmány szerinti gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazott egyik konkrét eljárás során (a standard protein-tisztítási rendszerben) a számos ismert puffer cserélő eljárás egyikével, például gél szűréssel tisztított t-PA-t alkalmazunk. Ezt az előnyös eljárást használtuk a következő stabilitási és oldhatósági vizsgálatokhoz felhasznált t-PA izolálására és tisztítására. Az előnyös módszer alkalmazása során felhasznált t-PA-t rekombináns úton módosított Chinese Hamster Ovary (CHO) sejtekből állítottuk elő, amelyek a CHO sejt tenyésztési táptalaján képesek a t-PA kiválasztott termékként történő termelésére.

Felismertük azt a meglepő jelenséget, hogy a t-PA-t tartalmazó gyógyszerkészítmények szignifikánsan stabilabb biológiai hatást mutatnak, ha egyik komponensük argininium iont tartalmazó puffer, és az ilyen készítményekben nem szükséges a nátrium-klorid jelenléte a stabilitás biztosításához, bár 0,3 mól alatt só-koncentráció megengedett. Egy előnyös megvalósítási mód esetében a klorid ion koncentráció 0,1 mól vagy ennél kevesebb. A természetes pH-tartományban, azaz körülbelül pH 6 és 8 között a t-PA oldhatósága úgy megnő az argininium ion jelenlétében, hogy viszonylag magas koncentrációjú készítmények állíthatók elő belőle, az irodalomban eddig erre a célra egyértelműen megkívánt nagy mennyiségű stabilizáló só jelenléte nélkül is.

A találmány ismertetésében használt „humán szövet plazminogén aktivátor”, „humán t-PA” vagy „t-PA” kifejezések humán extrinsic (szövet-típusú) plazminogén aktivátort jelölnek, amelynek előállítása például természetes forrásból extrakcióval és tisztítással (lásd Collen és munkatársai korábban idézett közleményét) történik, és rekombináns szövet tenyésztési rendszerekben, az itt ismertetett módon. Szekvenciája és jellemzői szerepelnek például a 93619 számon, 1983. november 9-én publikált európai szabadalmi bejelentésben, melynek elsőbbsége 1982. május 5. Lásd még a 41766 számon, 1981. december 16-án közrebocsátott, 1980. június 11-i elsőbbségű európai szabadalmi bejelentést és Rijken és munkatársai, Journal of Biol. Chem., 7035 (1981) közleményét. A kifejezések hasonlóképpen a biológiailag aktív humán szövet plazminogén aktivátor ekvivalenseket is felölelik, amelyek egy vagy több aminosavban különböznek az általános szekvenciától, vagy a glikozilezés mértékében. Ezek a tulajdonságok függenek az alkalmazott, konkrét tenyésztési körülményektől, és attól a gazdától, amelyből a szövet plazminogén aktivátort kinyerjük.

A. Ábra ismertetés

Az 1. ábra a t-PA különböző készítményekben mutatott stabilitását szemlélteti.

A 2. ábrán az arginin-koncentrációnak a t-PA oldhatóságára mutatott hatása szerepel.

A 3. ábra a t-PA oldhatósági határait mutatja be az argininium foszfát pufferek koncentrációi esetében, 6 pH-értéken, 4 °C-on.

B. Liofilizálás

A készítmény liofilizálását vagy fagyasztva szárítását a szakember számára jól ismert eljárások és berendezések felhasználásával végezzük. Jellegzetesen a készítményt először nyilvánvaló eutektikus vagy összeesési hőmérséklete alá fagyasztjuk. Ezután vákuumot alkalmazunk, és a liofilizáló polcotkat melegítjük, hogy a jeget szublimálással eltávolítsuk, a polc hőmérséklete és a kamra nyomást úgy választva meg, hogy a fagyott massa hőmérséklete az eutektikus vagy összeesési hőmérséklet alatt maradjon mindaddig, míg lényegében a jég teljes mennyiségét eltávolítottuk. Ezt az „elsőleges szárítási” fázist követően a polcok hőmérséklete tovább emelhető (kamra nyomás egyidejű megváltoztatásával vagy anélkül), és a fagyasztva szárítással kapott pogácsa maradék nedvességtartalmát elhajtjuk.

C. S-2288 vizsgálat

Az S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-p-nitro-anilid · 2HCl) szintetikus polipeptid szubsztrátot

t-PA-val hidrolizáljuk, és így szíves p-nitro-anilint és tripeptidet állítunk elő. A szubsztrát és a termék (p-nitro-anilin) közötti maximális differenciális abszorpció 405 nm-nél mutatkozik. A p-nitro-anilin keletkezését spektrofotometriásan követjük, a 405 nm-en észlelt abszorpciót az idő függvényében vizsgálva. A kapott abszorpció - idő görbe meredeksége arányos a t-PA aktivitással. A vizsgálatot $37 \pm 0,2$ °C-on végezzük.

A vizsgálat során 20 - 100 mikroliter t-PA mintát adtunk 1,2 ml reakcióelegyhez, amely 0,33 mmól S-2288-at, 0,067 mól Tris-puffert (pH 7,4) és 0,07 mól nátrium-kloridot tartalmazott, és amelyet 37 °C-on 10 percig inkubáltunk. Az abszorpcióban észlelt változást 1 percig követtük, és az aktivitást a 405 nm-en észlelt abszorpcióból a keletkező, a gyártó által standardizált egyenlet felhasználásával:

Aktivitás (IE, nemzetközi egység) =

$$= \frac{\text{OD} \times 793,65 \text{ (higitási faktor)}}{\text{inkubálási idő} \times \text{minta térfogat}}$$

D. Példák

1. példa

Tisztított t-PA-t 0,2 mg/ml végső koncentrációig higitottuk, majd egy alikvot mintát az 1. táblázatban felsorolt pufferekkel szemben dializáltunk.

0,01 % Polysorbate 80-at tartalmazó dialízis puffer

Dialízis koncentráció
NaCl arginin (HCl)

1. 0,01 mól nátrium-foszfát pH 6
2. 0,01 mól nátrium-foszfát pH 6
3. 0,01 mól nátrium-foszfát pH 6
4. 0,01 mól nátrium-acetát pH 5
5. 0,01 mól nátrium-acetát pH 5
6. 0,01 mól nátrium-acetát pH 5

- | | |
|----------|---------|
| - | - |
| 0,12 mól | 0,2 mól |
| - | 0,2 mól |
| - | - |
| 0,12 mól | 0,2 mól |
| - | 0,2 mól |

Dialízis után a mintákat centrifugáltuk, és a felülúszót 1 ml-es alikvotokban liofilizáltuk. A liofilizált mintákat vízzel visszahigitottuk, és a t-PA aktivitást az S-2288 tesztel vizsgáltuk. Minden visszahigitott mintát 37 °C hőmérsékleten tartottunk és különböző időpontokban vizsgáltunk.

A kísérlet eredményeit az 1. ábrán mutatjuk be. Mint látható, az arginint nem tartalmazó rendszerek nem gátolják meg a t-PA aktivitás csökkenését az idővel. Azokban a mintákban, amelyek 0,2 mól arginint vagy 0,2 mól arginint és fiziológias mennyiségű kloridot tartalmaznak, 4 napos 37 °C-on végzett

inkubálás után a kezdeti t-PA aktivitás csaknem teljes mértékben fennmarad. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy 0,2 mól arginin - nátrium-kloriddal együtt vagy anélkül - szignifikánsan stabilizálja a t-PA-t.

2. példa

A t-PA stabilitást az arginin-koncentráció függvényében úgy határoztuk meg, hogy mértük a t-PA aktivitás csökkenésének mértékét különböző hőmérsékleteken.

- Készítmény: 1. 1,355 mg/ml t-PA
0,05 mól nátrium-foszfát
pH 6,2
0,05 mól arginin-hidroklo-
rid
2. 0,498 mg/ml t-PA
0,03 mól nátrium-foszfát
pH 6,2
0,2 mól arginin-hidroklorid

A fenti összetételű készítmények 0,5 ml-es alikvot mintáit aszeptikus körülmények között 2 ml-es üveg ampullákba töltöttük,

5 melyeket lezártunk. Az ampullákat 25 °C-on, 37 °C-on és 45 °C-on tartottuk. Minden oldatból két-két ampullából mintát vettünk a 0., 20., 55. és 160. napon, és a t-PA aktivitást az S-2288 módszerrel vizsgáltuk. A fennmaradó %-os aktivitás természetes logaritmusát feltüntettük az idő függvényében (napok) minden egyes hőmérsékleten, majd kiszámoltuk a sebességi állandót a lineáris regressziós analízis alkalmazásával.

10 A t-PA stabilitás csökkenésének sebességi állandóját (k) két különböző arginin-koncentráció esetében és különböző hőmérsékleteken a 2. táblázatban tüntetjük fel.

2. táblázat

Az arginin hatása a t-PA stabilitására

Készítmény	Arginin	k (nap ⁻¹)		
		25 °C	37 °C	45 °C
0,05 mól Na-foszfát pH 6,2	0,05 mól	0,00137	0,0102	0,0167
0,03 mól Na-foszfát pH 6,2	0,20 mól	0,00043	0,00569	0,01272

Mint látható, 0,2 mól arginin olyan sebességi állandót eredményez, amely kisebb, mint a 0,05 mól arginin esetében kapott, mindegyik vizsgált hőmérsékleten, ami azt mutatja, hogy az arginin-koncentráció növekedése növeli a t-PA stabilitását.

30 sékleten. Az eredményeket a 3. táblázatban adjuk meg.

3. táblázat

A Polysorbate 80 hatása a t-PA stabilitására

3. példa

A t-PA stabilitása a nem-ionos felületaktív anyagok koncentrációjának is függvénye. A megfelelő adatokat a 3. táblázat tartalmazza.

A t-PA-t 0,01 mólos Na-szukcinát pufferrel, pH 6,0-on végzett dialízissel csaptuk ki. A t-PA precipitátumot centrifugálással gyűjtöttük össze a dializált mintából.

Ezt a csapadékot újból feloldottuk az alábbi készítményben, amely változó koncentrációban tartalmazta a polysorbate 80-at.

Készítmény: 0,2 mól arginin-hidroklorid
0,02 mól nátrium-foszfát
pH 7,2
Polysorbate 80 (0,0005-0,10 %)

Az oldatokat aszeptikus körülmények között ampullákba töltöttük, és 35 °C-on illetve 40 °C-on tartottuk. Minden időpontban két-két kémcsőből mintát vettünk, és az enzimatis aktivitást az S-2288 vizsgálattal vizsgáltuk.

A sebességi állandókat a 10 g (t-PA aktivitás) lineáris regressziós analízisével számoltuk az idő függvényében minden hőmér-

Polysorbate 80	k (nap ⁻¹)	
	35°C	40°C
0,0005	0,0055	0,0106
0,05	0,0049	0,0091
0,01	0,0043	0,0088
0,025	0,0040	0,0081
0,05	0,0041	0,0077
0,10	0,0037	0,0075

50 A táblázat adatai azt mutatják, hogy amint a polysorbate 80 koncentrációja nő, a sebességi állandó (k) csökken. Ezt az jelzi, hogy több polysorbate 80 jobb stabilitást biztosít.

4. példa

Tisztított t-PA-t az alábbi argininium-foszfát puffer készítménnyel szemben dializálva t-PA oldatokat készítettünk, amelyeket további pufferrel a kívánt végső t-PA koncentrációra hígítottunk.

Puffer: 0,02 mól arginin
0,18 mól foszforsav
0,01 % Polysorbate 80 pH 6

Minden készítményből alikvot mintákat vettünk, melyeket aseptikus körülmények között 5 vagy 10 ml-es ampullákba töltöt-

tünk, liofilizáltunk, majd az ampullákat lezártuk. Az ampullákat különböző hőmérsékleteken tároltuk. Minden időpontban készítményenként két-két ampullából mintát vettünk, és a t-PA aktivitást az S-2288 vizsgálattal határoztuk meg. Az eredményeket a 4. táblázatban tüntetjük fel.

4. táblázat

A t-PA stabilitása liofilizált készítményekben

t-PA mg/ml*	Idő pH	mo	Maradék % (két mérés átlaga ± standard hiba)	5 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
1,0	6,0	2,0	102,5±0,0	103,3±2,5	-	-	102,6±3,0	-
2,0	6,0	2,0	111,3±0,7	111,1±0,1	-	-	114,6±2,2	-
5,0	6,0	2,0	112,0±0,3	112,7±0,6	-	-	112,3±1,4	-
1,0	6,0	3,5	98,2±1,3	-	96,0±1,7	-	-	97,7±0,01

* A t-PA koncentrációja a liofilizálás előtti oldatban.

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a t-PA stabil liofilizált formában.

25

5. példa

Körülbelül 0,3-0,5 mg/ml t-PA-t tartalmazó oldatot 10 mmól nátrium-foszfátot (pH 7,5), 0,01% polysorbate 80-at és arginin-hidrokloridot különböző koncentrációkban tartalmazó oldattal szemben dializáltunk. Az oldhatatlan anyagot 2 perces, Eppendorf mikrocentrifugával végzett centrifugálással eltávolítottuk. Az oldatban maradt t-PA mennyiséget S-2288 vizsgálattal határoztuk meg. Az eredményeket a 2. ábra mutatja.

Már 50 mmól arginin is szignifikánsan növeli a t-PA oldhatóságát. A nagyobb arginin-koncentrációk esetében tapasztalt látszólag kisebb oldékonyság növekedés azzal magyarázható, hogy a kiindulási anyagban az eredeti t-PA koncentráció csak 0,3-0,5 mg/ml volt, és így soha nem sikerült elérni a határ oldékonyságot.

oldhatatlan anyagok eltávolítása céljából, majd a felülszókban az oldott t-PA-t a S-2288 módszerrel határoztuk meg.

Az eredményeket a 3. ábrán szemléltetjük. Ha a t-PA teljesen oldható az eredetileg hozzáadott t-PA koncentrációnál, az oldható t-PA koncentrációjának a hozzáadott koncentrációval azonosnak kell lennie. Megfordítva, ha a t-PA nem teljesen oldható az eredetileg hozzáadott koncentrációban, a 3. ábra azt mutatja, hogy 6,0 pH-jú 100 mmólos arginin-foszfát pufferben a t-PA körülbelül 2 mg/ml koncentrációig oldható, és nagyobb arginin-foszfát koncentráció esetében az oldhatóság jelentősen megnő. Különösen, 6,0 pH-jú, 200 mmólos arginin-foszfát pufferrel a t-PA 54 mg/ml koncentrációban is teljesen oldható, és a határ oldékonyság nyilvánvalóan ennél is lényegesen magasabb.

7. példa

Az alábbi argininium-foszfát rendszert prelioilizált oldatként állítottuk elő. Prelioilizált oldat

	mg/ml
t-PA	2,5
L-arginin	87,1
foszforsav	26,8
Polysorbate 80	0,1
pH 7,2	

Steril szűrést követően körülbelül 20 ml-es alikvot mintákat 50 ml-es ampullákba töltöttünk. A liofilizálást a következőképpen végeztük:

a) Az ampullákat liofilizáló berendezésbe helyeztük, és -50 °C-on (polc hőmérsék-

6. példa

A t-PA-t 0,001 mól nátrium-szukcinát (pH 6) pufferrel szembeni dialízissal csaptuk ki. A kapott csapadékot centrifugálással izoláltuk, majd az anyag mért mennyiségét a kívánt puffer rendszer 1 ml-ében 20 órán át 5 °C-on, keverés közben egyensúlyba hoztuk. A tanulmányozott puffer rendszereket úgy készítettük, hogy az arginint foszforsavval titrálva 6,0 pH-értékű argininium-foszfát rendszert hoztunk létre. A törzsoldatokat vízzel hígítva állítottuk elő a végső, 0,10-0,20 mól arginint argininium ion formájában tartalmazó puffer oldatokat. A kívánt puffer rendszerrel végzett kiegyenlítést követően a kapott t-PA készítményeket centrifugáltuk, az

65

let), környezeti nyomáson, 10 órán át fagyasztottuk.

- b) Vákuumot hoztunk létre (kamra nyomás 200 Hgum), és a polc hőmérsékletet 10 °/óra sebességgel +7 °C-ra emeltük, majd 41 órán át ezen a hőfokon tartottuk.

- c) Ezután a polc hőmérsékletet +35 °C-ra emeltük, és a kamra nyomást 50 µm-re csökkentettük, majd a rendszert 14 órán át ebben az állapotban tartottuk.

Ezután az ampullákat ledugaszoltuk, a nyomást hagytuk visszaállni a környezeti nyomás értékre, és az ampullákat eltávolítottuk a liofilizáló berendezésből.

15

8. példa

Megvizsgáltuk a nátrium-klorid hatását a liofilizált arginin-foszfát pogácsák minőségére. 0,8 mólos arginin (pH 7) és 0,2 mólos arginin (pH 6) mintákat készítettünk foszfát-só formájában, amelyek 0,01-500 mmól koncentrációban tartalmazzak nátrium-kloridot. Minden oldat 2 ml-es alikvot mennyiséget 10 ml-es ampullákba töltöttük, és a következő ciklust követve liofilizáltuk:

Liofilizálási lépés	Polchőmérséklet (°C)	Kamranyomás (mikron)	Idő (óra)
Fagyasztás	-45	környezeti	10
első szárítás	emelés 20 °/óra sebességgel -35 °C-ra majd 3 °/óra sebességgel +35 °C-ra	50	24
második szárítás	+35	40	26

A kapott anyag minőségét az 5. táblázatban adjuk meg. Az adatok azt mutatják, hogy gyógyászati lag elfogadható anyagot csak olyan összetételből kapunk, amelynek nátrium-klorid koncentrációja alacsony, és a még elfogadható alacsony nátrium-klorid szint az arginin koncentráció függvénye.

35

5. táblázat

A liofilizált arginin puffer rendszer minősége különböző nátrium-klorid koncentrációk esetén

nátrium-klorid mmól	Kezdeti 0,8 mól arginin	Minőség	
		0,8 mól arginin	2 hónapi szobahőn történő tárolás után 0,2 mól arginin
500	üveges, összezugorodott massza; nincs pogácsa	szemcsés, zsugorodott massza, nincs pogácsa	a kezdetivel azonos
100	fehér pogácsa; oldaltalain enyhén olvadt	fehér, üveges megjelésű pogácsa	az ampulla alján üveges film, nincs pogácsa
50	fehér pogácsa; üveges élén enyhén zsugorodott	fehér, üveges megjelésű pogácsa	üveges-fehér massza az ampulla alján
10	fehér pogácsa; enyhén zsugorodott	fehér, igen erősen zsugorodott pogácsa	fehér massza az ampullában
1	fehér pogácsa; igen enyhén zsugorodott	fehér, igen erősen zsugorodott pogácsa	tovább zsugorodott
0,1	fehér pogácsa, igen enyhén zsugorodott	fehér, igen erősen zsugorodott pogácsa	tovább zsugorodott
0,01	fehér pogácsa, igen enyhén zsugorodott	fehér, igen erősen zsugorodott pogácsa	kismértékű további zsugorodás

Szakember számára nyilvánvaló, hogy a leírtak különböző módosításaira van lehetőség, és az ilyen módosítások is a találmány tárgykörébe tartoznak.

5

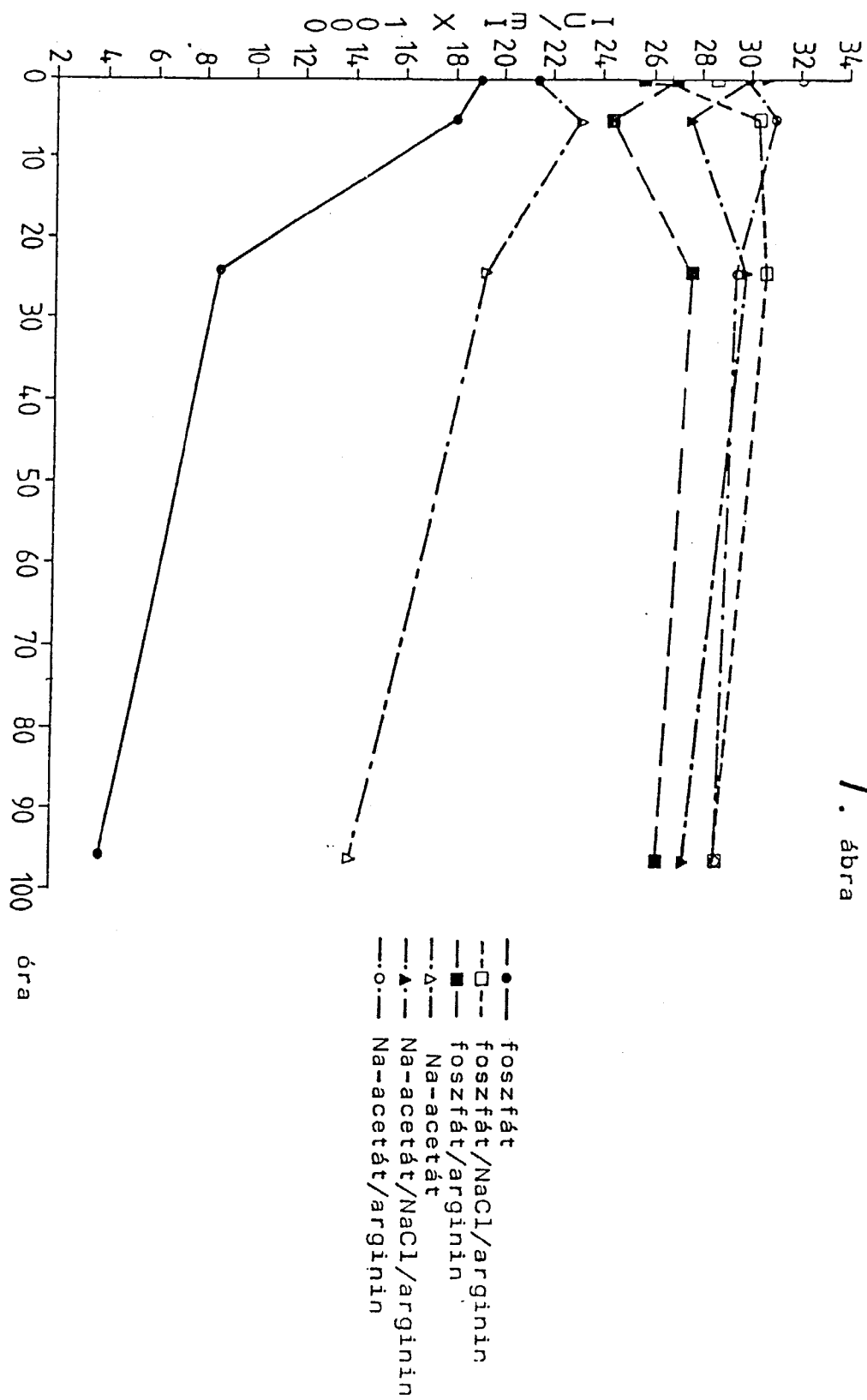
SZABADALMI IGÉNYPONTOK

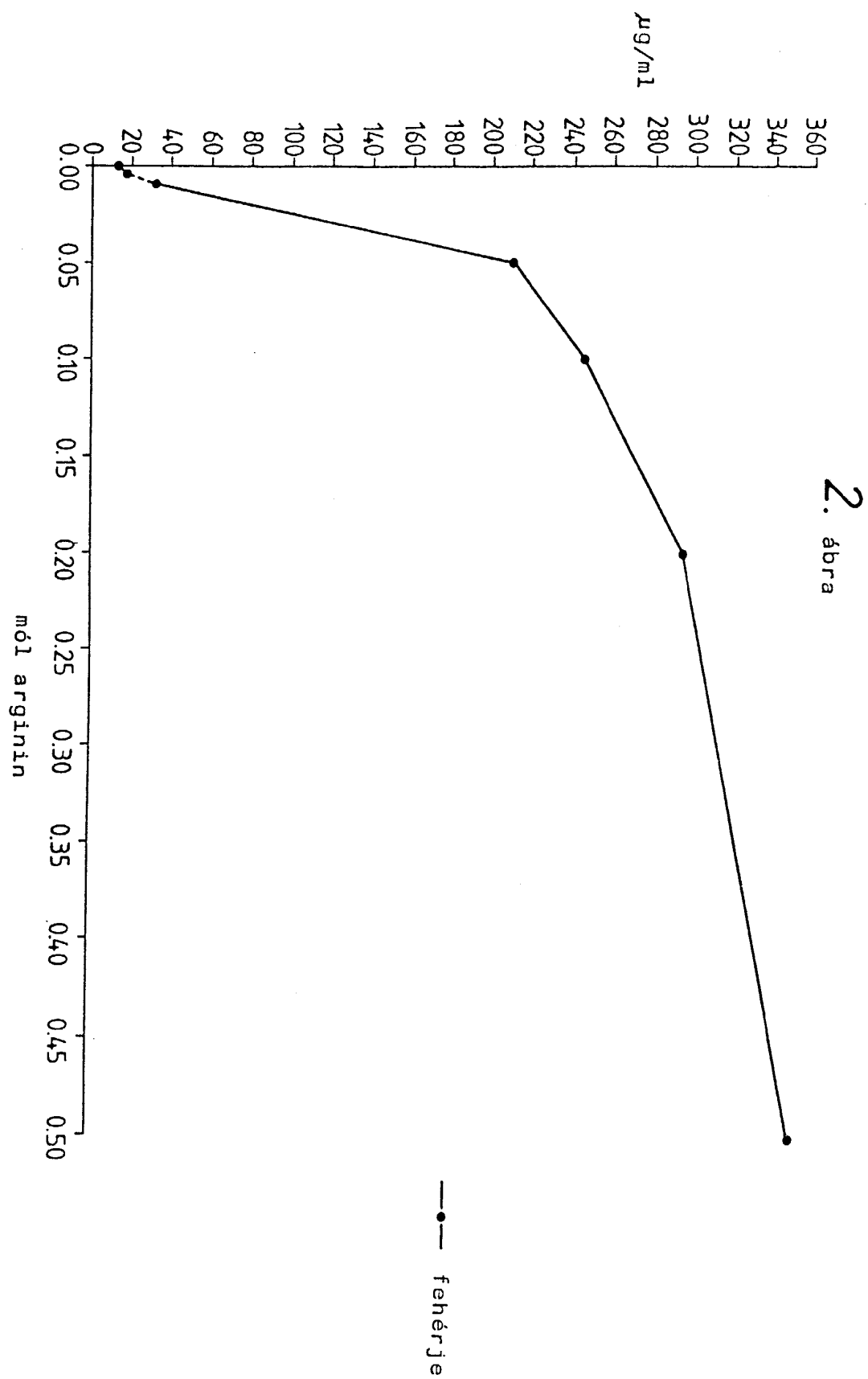
1. Eljárás hatóanyagként humán szövet plazminogén aktivátort tartalmazó stabilizált, 10
 folyékony gyógyszerkészítmény vagy abból készült szilárd liofilizátum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 0,1-50 mg/ml humán szövet plazminogén aktivátort vizes oldatban 0,02-
 -1 mól/liter argininium-iont szolgáltató ve- 15
 gyületet tartalmazó, 4 és 9 közötti pH-értéket biztosító, gyógyászati szempontból elfogadható pufferrel és kívánt esetben 0,0005-
 -1 tömeg/tf.% gyógyászati szempontból elfogadható, nem-ionos felületaktív szerrel és/- 20
 vagy egy- vagy többféle gyógyászati szempontból elfogadható hígítószerrel elegyítünk, úgy választva meg az említett anyagokat és az esetleges adalékokat, hogy a készítmény klorid-ion tartalma 0,3 mól/liter alatt legyen, 25
 és kívánt esetben az elegyet liofilizáljuk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás humán szövet plazminogén aktivátort tartalmazó, stabil, száraz gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igény- 30
 pont szerint előállított vizes oldatot liofilizáljuk.
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy argininium-iont tartalmazó vegyületként az arginin valamely gyógyászati 35
 szempontból elfogadható savaddíciós sóját használjuk, argininium-klorid kivételével.
4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az ellenion foszfát.
5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal* 40
jellemezve, hogy a humán szövet plazminogén aktivátort 0,4-5,0 mg/ml és az argininium-iont 0,1-0,5 mól/l koncentrációban alkalmazzuk.

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest - A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető
 R 4927 - KJK

90.2857.66-13-2 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Szabó Viktor vezérigazgató

1. ábra





3. ábra

